

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-141598

(43)Date of publication of application : 14.06.1988

(51)Int. Cl.

G12Q 1/00
G01N 33/66

(21)Application number : 61-288244

(71)Applicant : WAKO PURE CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 03.12.1986

(72)Inventor : ASHIDA MASAOKI
TSUCHIYA MASAKAZU
SAKATA YOSHITSUGU

(54) NOVEL DETERMINATION REAGENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To improve the accuracy of the detection of mycotic contamination or product inspection of cellulosic blood dialysis membrane, etc., by preparing a reagent containing a component specifically reactive with β -1,3-glucan obtained from body fluid of insect.

CONSTITUTION: Physiological saline water containing sugar cane factor as an impurity is injected into the body cavity of an insect. Hemolymph is collected from the cavity, centrifuged to separate blood cells and dialyzed to obtain plasma. A component specifically reacting with peptidoglycan and exhibiting enzymatic activity is removed from the blood plasma to obtain a component specifically reactive with β -1,3-glucan and a reagent containing said component is prepared therefrom. The reagent is made to react with a specimen and the time to develop the enzymatic activity is measured to determine the amount of β -1,3-glucan.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑬ 公開特許公報(A)

昭63-141598

⑫ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)6月14日

C 12 Q 1/00
G 01 N 33/66

Z-8412-4B
C-8305-2G

審査請求 未請求 発明の数 3 (全7頁)

⑯ 発明の名称 新規測定試薬

⑰ 特 願 昭61-288244

⑱ 出 願 昭61(1986)12月3日

⑲ 発 明 者 芦 田 正 明 北海道札幌市西区八軒1-西4-1-17-34

⑲ 発 明 者 土 谷 正 和 兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪
研究所内

⑲ 発 明 者 佐 方 由 嗣 兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪
研究所内

⑲ 出 願 人 和光純薬工業株式会社 大阪府大阪市東区道修町3丁目10番地

明 細 書

1. 発明の名称

新規測定試薬

2. 特許請求の範囲

(1) 昆虫の体液から得られる、 β -1,3-グルカンに特異的に反応する成分を含んで成る試薬。

(2) 昆虫の体液から得られる、 β -1,3-グルカンに特異的に反応する成分を含んで成る試薬と検体とを反応させ、生ずる酵素活性を測定することにより β -1,3-グルカンの定量を行うことを特徴とする β -1,3-グルカンの定量方法。

(3) 昆虫の体液から得られる、 β -1,3-グルカンに特異的に反応する成分を含んで成る試薬と検体とを反応させ、酵素活性の発現時間を測定することにより β -1,3-グルカンの定量を行うことを特徴とする β -1,3-グルカンの定量方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、 β -1,3-グルカンに特異的に反応する成分を含んで成る試薬及びそれを用いた β -

1,3-グルカンの定量方法に関する。

[発明の背景]

β -1,3-グルカン(以下、 β -Gと略称する。)

は、自然界には、酵母やカビの細胞壁の骨格構成物として、また多くの担子菌子實體(キノコ)の主要な多糖成分として存在している。カプトガニ血球成分を用いたエンドトキシン検出方法である所謂リムルステストに於て陽性を示すことはよく知られており、その性質を利用して、カプトガニ血球成分から精製された試薬を用いて β -Gを特異的に定量する方法が発見されているが(臨床病理, 33 639-644, 1985)、未だ実用化には到っていない。また、本発明者の一部らは、蚤から得られた体液が、エンドトキシンとは反応しないが、 β -Gまたはペプチドグリカン(以下、PGと略称する。)と反応し、それにより少なくとも3種の酵素、即ち、N- α -ベンゾイル-L-アルギニンエチルエステル分解酵素(以下、BAEEaseと略称する。)、プロ-フェノールオキシダーゼ活性化酵素(以下、PPAEと略称する。)及びフェノー

ルオキシダーゼ(以下、POと略称する。)が活性化されることを先に見い出した(Insect Biochem., 16, 539~545, 1986)が、特異性に問題があるため、これを β -Gの定量に応用する迄には到らなかった。

このように、定量方法が未だ確立していないためもあって、 β -Gの人体への影響についてはいまだところ不明な点が多いが、最近では、セルロース系血液透析膜使用時に起こるショックの一因であるとの説いや、真菌感染症の患者の体液中に存在するという示唆等もあり、 β -Gの定量は、医学、薬学、微生物学の分野で今後ますます重要となると考えられている。

〔発明の目的〕

本発明は上記した如き状況に鑑みなされたもので、 β -Gに特異的に反応する成分を含んで成る試薬とそれを用いた β -Gの定量方法を提供することを目的とする。

〔発明の構成〕

本発明は、昆虫の体液から得られる、 β -1,3

(hemolymph) が最も得られやすくより一般的である。

体液を得る方法としては、例えば、本発明者の一部が行った方法(Insect Biochem., 11, 57~65, 1981)がある。即ち、昆虫を氷上に置き動きを止めた後、トウキビ因子(サトウキビに含まれるグルコース、アミノ酸などから成る高分子物質)を不純物として含む蔗糖、またはトウキビ因子そのものを含む生理食塩水を体腔に注射し、その後しばらく放置して、体腔よりヘモリンパを集める。集めた液を遠心分離器にかけ血球を除いた後透析すれば血漿が得られる。

このようにして得られた血漿中には、エンドトキシンとは反応しないが β -Gと特異的に反応して酵素活性を発現する物質(或は発現を誘引する物質)と、PGと特異的に反応して酵素活性を発現する物質(或は発現を誘引する物質)と、 β -G, PGのいずれとも反応して酵素活性を発現する物質(或は発現を誘引する物質)とが共存しているので、このうちPGと反応して酵素活性を発現する(或は発現を誘引する)成分を除去すれば、

-グルカンに特異的に反応する成分を含んで成る試薬及び該試薬を用いることを特徴とする β -1,3-グルカンの定量方法の発明である。

即ち、本発明者らは昆虫の体液から β -Gと特異的に反応して酵素活性を発現する物質を取り出すべく鋭意研究を重ねた結果、この分離精製に成功し、これを β -Gを含む検体と反応させ、発現するBAEE₄₀₀, PPAE, PO等の酵素活性を測定することにより、或は、これらの酵素活性の発現時間を測定することにより、 β -Gの定量が可能となることを見出し本発明を完成するに至った。

本発明に用いることのできる体液の得られる昆虫としては、特に制限はないが、なるべく大型のもので飼育方法の確立しているものが望ましく、例えば、タバコスズメガ、カイコガ等の鱗翅類、センチクバエ、イエバエ等の双翅類、トノサマバット、エンマコオロヤ等の直翅類、センノキカミヤリ等の甲虫類等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

体液としては、体腔から得られるヘモリンパ

これを β -Gと特異的に反応する成分とすることができ。

昆虫の血漿から、PGと反応して酵素活性を発現する(或は発現を誘引する)成分を除去する方法としては、ゲル濾過法、電気泳動法、高速液体クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法等、一般に生化学の分野で用いられている分離精製法がいずれも挙げられるが、PGを結合させた担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーによりこれを行えば、極めて容易に且つ効率よくこれを行うことができるので、特に好ましい。以下、この方法について述べる。

PGを結合させる担体としては、セルロース、アガロース、デキストラン、ポリアクリルアミド、多孔性ガラス等、アフィニティークロマトグラフィーに於て通常用いられている担体は、いずれも使用可能であるが、中でもアガロースが特に好ましい。アガロース系担体の具体的商品としては、セファロース(ファルマシア社)、バイオゲルA(BIO-RAD社)等があり、デキストラン系のものと

しては、セファダックス(ファルマシア社)、セファクリル(ファルマシア社)が、また、ポリアクリルアミド系のものであれば、エンザフィックスP(和光純薬工業(株))、バイオゲルP(BIO-RAD社)等が夫々市販されているが、これらに限定されるものではない。これらの担体にPGを結合させる為には担体を活性化させる必要があることは言うまでもない。担体の活性化法は種々あり、特に限定されるものではないが、例えば、アガロース系担体の場合には、CNBrによる活性化が最も一般的でよく用いられる。また、活性化アガロースとしては、他にエポキシ活性化アガロース等もあるが、同様に使用可能であることは言うまでもない。

担体に結合させるPGとしては、各種細菌(例えば、Micrococcus属、Streptococcus属、Mycobacterium属、Bacillus属、Staphylococcus属等)の細胞壁から得られる天然のそれでもよいし、また、卵白リゾチーム等適当な酵素で或る程度分解(消化)したものでよい。

た担体(若しくはPGからなる担体)を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより処理すれば、 β -Gと特異的に反応する成分が容易に得られるので、これを定量用試薬として用いて β -Gの定量を行えばよい。

β -Gの定量を行うには、 β -Gを含む検体と、上記 β -Gと特異的に反応する成分からなる試薬(以下、 β -G試薬と略称する。)とをよく混合して反応液とし、一定時間後の反応液中の酵素活性、例えば、BAEE₉₀、PPAE、PO等の活性を自体公知の測定方法に従って測定し、予め、濃度既知の β -Gの標準液を用いて同様の操作により作成した検量線から β -Gの定量を行ってもよい(以下、本法をエンド法と略称する。)、また、PGの活性化に要する時間が検体中の β -G濃度に依存する現象を利用して、 β -G試薬と検体とを混合した後、PGによる反応生成物の量がある一定値となるまでの時間を測定する方法(本発明者らが見出した方法。以下、タイム法と略称する。)によってこれを行ってもよい。

尚、PGを上記した如き担体に結合して用いる代りに、PGそのものを担体として用いてアフィニティークロマトグラフィーを行うことも勿論可能である。

アフィニティークロマトグラフィーをより効果的に行うには、予め血漿中にキレート剤等を添加して体液中に存在する Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等2価の陽イオンの影響を除いた状態にした後これを行うことが望ましい。この目的で用いられるキレート剤としては、例えば、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム(EDTA)、エチレンジアミンビス(β -アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-四酢酸ナトリウム(EGTA)等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。キレート剤の使用量は特に限定されるものではないが、通常、血漿中の濃度が1mM~10mM程度になるように用いられる。

アフィニティークロマトグラフィーの操作法自体は自体公知のアフィニティークロマトグラフィーの操作法に従ってこれを行えば足りる。

このようにして、昆虫の血漿をPGを結合させ

これらいずれの方法で行うにせよ、この定量を行う際には、先に β -Gに特異的に反応する成分を取り出す際に除去した2価の金属イオン、例えば、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等を反応液中に改めて添加してやる必要がある。その濃度としては、反応液中の最終濃度として、4mM~10mM程度が好ましく用いられる。

酵素活性測定に必要な、基質、緩衝剤、共役酵素、補酵素等、更には、要すれば、発色剤、酵素試活剤、酵素や色素の安定化剤、界面活性剤等、目的とする酵素活性の測定法として自体公知の方法に於て使用されるものは当然のことながら本発明に於てもそれに準じて使用されるが、これらは予め β -G試薬中に溶解しておいてもよいし、また、エンド法で行う場合には、別に酵素活性測定用の試液を準備しておき、反応液の1部を採取しそれを試料として改めて酵素活性を測定してもよい。

これらの方法により β -Gの定量を行う際、 β -Gを含む検体と β -G試薬との反応温度は、反応が進行する温度であれば特に限定はされないが、

通常、20～40℃が好ましく用いられる。

反応pHは、測定する酵素の種類によって当然異ってくるが、通常、pH6～10が好ましく用いられる。またこの反応pHを維持する為、通常緩衝剤が用いられるが、この緩衝剤としては反応に影響を与えないものであれば種類及び使用量に特に制約はなく、例えば、リン酸塩、ホウ酸塩、酢酸塩、トリス緩衝液、グッズ(Good's)緩衝液等がいずれも挙げられる。

本発明の方法により測定可能な β -Gとしては、例えば、ザイモサン、カードラン、バキマン等の所謂 β -Gの他、 β -1,3-結合を有するグルコースポリマーやその誘導体、例えばスクレトタン、レンタナン、シゾフィラン、コリオラン、ラミナラン、リケナンなども挙げられる。

以下に実施例及び参考例を挙げ、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

〔実施例〕

参考例 1. 蚕血漿の調製法

心分離して沈澱を除去し、さらに上清を20,000×gで45分間遠心分離した。得られた沈澱を1M NaCl溶液150mlに懸濁し、遠心分離により2,200×g～20,000×gの分画を集め粗細胞壁標品とした。

得られた粗細胞壁標品を80mlの水に懸濁し、100℃で20分間加熱したのち冷却し、2M酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.9)140ml及びRNA分解酵素10mgを加え37℃で3時間反応させた。その後20,000×gで1時間遠心分離し、得られた沈澱を50mMトリス-塩酸緩衝液(20mM MgCl₂、1mM CaCl₂及び7mMのDNase I (Sigma社製)を含む、pH7.5)に懸濁し37℃で3時間反応させた。その後、20,000×gで1時間遠心分離し、得られた沈澱を0.4Mデジレン硫酸ナトリウム溶液100mlに懸濁して室温で1時間放置した。その後沈澱を蒸留水で6回洗浄し、凍結乾燥して精製細胞壁標品とした。

得られた精製細胞壁標品を0.1N塩酸中に懸濁し60℃で24時間放置後、20,000×gで1時間遠心分離し、得られた沈澱を蒸留水で洗浄した後、

芦田法(Insect Biochem., 11, 57-65, 1981)に従って以下のように行った。

第五齢の蚕幼虫を氷上に10分間置き動きを止めた後、20mMのサトウキビから精製された蔗糖、または6μg/mlのトウキビ因子を含む生理食塩水を蚕の体重の半量分、蚕の第5及び第6腹部節の間より注射した。注射した液が漏れないように細い糸で第5腹部節の前で縛り、20分室温放置後、第3腹部節の足を切ってヘモリンパ(hemolymph)を集めた。集めたヘモリンパを1,500×gで5分間、低温で遠心し血球を除いた。上清約100mlを0.01M-トリス-リンゴ酸緩衝液(0.15MのKClを含有、pH6.5)3ℓ中で、2日間、低温下透析を行い目的の蚕血漿とした。

参考例 2. ペプテドグリカンの調製

マイクロコッカス ルテウス(Micrococcus luteus) ATCC 4698の菌体を冷水150ml中に懸濁し、直径0.1mmのガラスビーズを0.6g/ml添加したのち0℃で超音波処理を行って菌体を破砕した。ガラスビーズを除去した後、2,200×gで10分間遠

凍結乾燥をしてペプテドグリカンを得た。

実施例 1.

(1) ペプテドグリカン固定化セファロース4Bカラムの調製

参考例2で得られた精製ペプテドグリカン153mgを80mM酢酸アンモニウム153mlに懸濁し、卵白リゾチーム1.5mgを加えて45℃で4分間攪拌加熱後、37℃で2時間消化した。ミリポアフィルター(HAWPO 4700)で濾過し、濾液を凍結乾燥した。凍結乾燥品を蒸留水6mlで溶解し、その5.5mlをセファデックスG-508Fのカラム(溶出液: 50mM炭酸アンモニウム溶液、2.5×90cm、溶出速度: 15ml/hr)でゲル濾過を行った。消化された結果生ずる還元糖の活性のある分画の中心部を集めて凍結乾燥し、その凍結乾燥品を0.1M炭酸ナトリウム緩衝液(pH10)6.3mlに溶解してペプテドグリカン溶液とした。このペプテドグリカン溶液とCNBr活性化セファロース4B(ファルマシア社製)2.7gを常法に従って反応させ、ペプテドグリカン固定化セファロース4Bとした。

この様にして得られた、ペプチドグリカン固定化セファロース4Bをカラム(0.6×1.7cm)に充填し、0.01Mトリス-リンゴ酸緩衝液(0.15M KCl及び1 mM EDTAを含む、pH 6.5)で平衡化し、PGカラムとした。

(2) β -G 試薬の調製

参考例1で得られた凝血漿に100 mM EDTA 溶液(pH 6.5)をEDTAの終濃度が1 mMとなるように添加し、その溶液1.5 mlを(1)で得られたPGカラムで処理した(溶出液: 0.15M KCl及び1 mM EDTA含有0.01Mトリス-リンゴ酸緩衝液、pH 6.5。溶出速度: 6 ml/hr)。試料を注入した直後から12 mlの溶出液を集め β -G 試薬とした。

(3) β -G 試薬及び凝血液中の不活性酵素のダイモサン(β -1,3-グルカン)又はPGによる活性化度の測定

(測定操作法)

参考例1で得られた凝血漿又は(2)で得られた β -G 試薬200 μ lに80 mM CaCl_2 溶液20 μ lを添加し、更に1 μ g/mlのダイモサン溶液あるいは1 μ g/ml

ベンゾイル-L-アルギニンエチルエステル、1 mM NAD(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)、0.1 μ g/ml アルコールデヒドロゲナーゼ、0.25Mトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン及び0.2 Mセミカルバジド含有、pH 8.5、at 25℃) 1 mlに試料30 μ lを加えてよく混合し、25℃で反応させて生ずるNADH(還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)の340 nmの吸光度の増加を測定した。

尚、BAEE₅₀₀の1単位(U)は上記反応条件下で1分間に1 μ molのエタノールを生成する量とした。

結果を表1に示す。

表 1

試 薬	試料溶液	BAEE ₅₀₀ 活性(U/ μ l)
凝 血 漿	ダイモサン溶液	93.7
	P.G 溶液	91.0
β -G 試薬	ダイモサン溶液	84.0
	P.G 溶液	0.0

これらの結果から明らかなように、凝血液中の

のPG溶液を20 μ l加えてよく混合し、25℃で反応させた。所定の時間に所定量の反応液を採取し、POの活性化度あるいはBAEE₅₀₀の活性値を測定した。

① PO 活性化度の測定

基質溶液(4 mM 4-メチルカタコール及び8 mM 4-ヒドロキシプロリンエチルエステル含有0.1 Mリン酸緩衝液、pH 6.0) 1 mlに試料(前記反応液) 10 μ lを加え30℃で10分間反応させた後、生成するキノン色素の520 nmの吸光度を測定してPOの活性化度を求めた。

第1図に各種試料を基質溶液と反応させたときの反応時間による520 nmに於ける吸光度の変化を示す。但し、—●—はダイモサンと β -G 試薬とを、—▲—はPGと β -G 試薬とを、—○—はダイモサンと凝血漿とを、また、—△—はPGと凝血漿とを夫々反応させて得られた試料を用いたときの吸光度変化を夫々示す。

② BAEE₅₀₀ 活性の測定

予め25℃に保温した基質溶液(2 mM N- α -

酵素はダイモサン及びPGによって活性化されるが、 β -G 試薬中の酵素はダイモサンによってのみ活性化され、PGによっては活性化されないことがわかる。

実施例 2. カードランによる検量線の作成(測定操作)

実施例1で得られた β -G 試薬2 mlに80 mM CaCl_2 溶液200 μ lを添加しよく混合した。この10 μ lに所定濃度のカードラン溶液10 μ lを加え30℃で60分間加熱後、実施例1で用いたPO活性測定用基質溶液1 mlを加え、更に30℃で10分間反応させた後、520 nmの吸光度を測定した(測定値: E_0)。カードラン溶液の代りに精製水を用いて同様に操作して盲検値(E_{0f})を得た。(結 果)

第2図に、カードラン濃度と($E_0 - E_{0f}$)値の関係を横軸、縦軸共に対数軸を用いて示した。

この結果から明らかな如く、良好な直線性が得られた。

実施例 3. カードランによる検量線の作成

(測定操作)

実施例1で得られた β -G試薬2 μ lに80mM CaCl_2 200 μ lを添加しよく混合した。この70 μ lに、0.1Mリン酸緩衝液(20mM L-ドーパ含有、pH 6.0) 70 μ l及び所定濃度のカードラン溶液70 μ lを加えてよく混合し、25℃で、トキシノメーター(和光純薬工業(株)製)を用いて透過光量が15%減少するまでの時間(Δt)を測定した。

(結果)

第3図に、 Δt とカードラン濃度の関係を横軸、縦軸共に対数軸を用いて示した。

この結果から明らかな如く、良好な直線性が得られた。

(発明の効果)

以上述べた如く、本発明は β -1,3-グルカンに特異的に反応する成分を含んで成る試薬、及び該試薬を用いた、 β -1,3-グルカンの定量方法を提供するものであり、本発明の定量法を用いることにより、真菌汚染の検出、セルロース系血液透析膜の製品検査、エンドトキシン以外のリムル

ヌチスト反応物質の検査等が可能となり、しかも、極めて容易に且つ精度よくこれを行うことができる点に甚だ顕著な効果を奏するものであり、新業に貢献するところ大なるものである。

4. 図面の簡単な説明

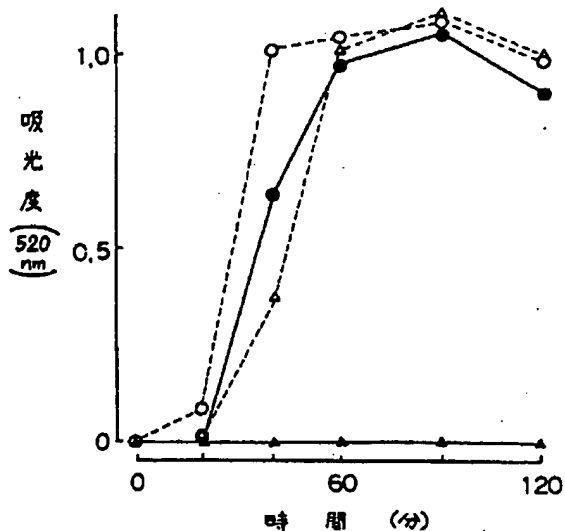
第1図は実施例1に於て得られた各種試料と基質溶液とを反応させたときの、反応時間による520nmに於ける吸光度の変化を示し、横軸の各時間(分)について得られた520nmの吸光度を縦軸に沿ってプロットした点を結んだものである。但し、—●—は試料として β -G試薬とサイモサンとの反応液を、—▲—は β -G試薬とPGとの反応液を、—○—は發血漿とサイモサンとの反応液を、また、—△—は發血漿とPGとの反応液を夫々用いた時の結果を示す。

第2図は、実施例2に於て得られた検量線を示し、横軸はカードラン濃度($\text{ng}/\mu\text{l}$)を、また、縦軸は520nmに於ける吸光度を夫々示す。

第3図は、実施例3に於て得られた検量線を示し、横軸はカードラン濃度($\text{ng}/\mu\text{l}$)を、また、縦

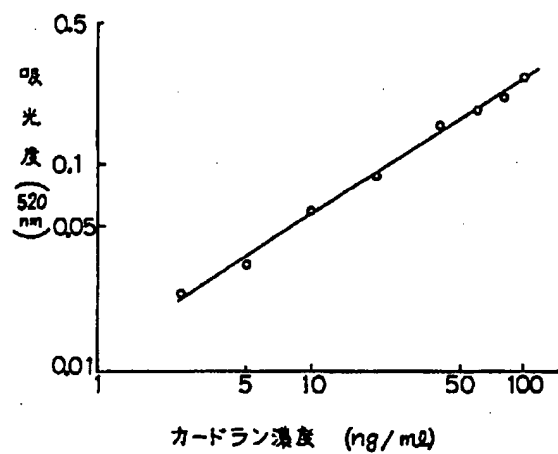
軸は透過光量が15%減少するまでの時間(分)を夫々示す。

第 1 図

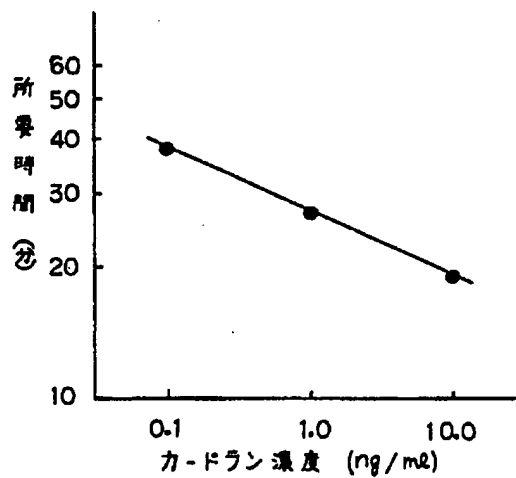


特許出願人 和光純薬工業株式会社

第 2 図



第 3 図



特開昭63-141598

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成6年(1994)4月26日

【公開番号】特開昭63-141598

【公開日】昭和63年(1988)6月14日

【年通号数】公開特許公報63-1416

【出願番号】特願昭61-288244

【国際特許分類第5版】

C12Q 1/00 Z 6807-48

G01N 33/66 C 7055-2J

手続補正書

平成 5 年 6 月 28 日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和61年特許第288244号

2. 発明の名称

新規測定装置

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 大阪府大阪市中央区道修町三丁目1番2号

「平成元年2月13日住所表示変更」

名称 和光純薬工業株式会社

代表者 一力 一生

4. 代理人

郵便番号 103

住所 東京都中央区日本橋本町4丁目5番13号

和光純薬工業株式会社 東京支店内

氏名 (8078) 弁護士 平 井 康 二

連絡先 (特許課) 03(5285)1345

5. 補正命令の日付

白 発

6. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄。

7. 補正の内容

(1)明細書2頁6行目から7行目にかけて記載の「カプトガニ血球成分を」を「 β -Gが、カプトカニ血球成分を」と補正する。

(2)明細書3頁2行目に記載の「見出した」を「見出した」と補正する。

(3)明細書10頁16行目に記載の「1部」を「一部」と補正する。

以 上